



УДК 577.29:577.35

РЕЦЕПТОРНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ [<sup>3</sup>H]БРАДИКИНИНА  
ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ КЛЕТОК  
МИОМЕТРИЯ КРЫС

Попкова Г. А., Астапова М. В., Иванова В. Т.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Из клеток миометрия крыс получены фракции плазматических мембран, саркоплазматического ретикулума, митохондрий и ядер. Субклеточные фракции идентифицированы путем определения биохимических маркеров и электронной микроскопией. Показано, что специфическое связывание [<sup>3</sup>H]брадикинина происходит только во фракции плазматических мембран, оно обратимо, зависит от температуры, концентрации мембранного белка и рН среды. Связывание подавляется высокими концентрациями немеченого брадикинина и не зависит от таких же концентраций адренокортикотропного гормона, окситоцина и сывороточного альбумина; характеризуется низкой константой диссоциации ( $K_d$   $2,7 \cdot 10^{-9}$  М) и ограниченным числом связывающих мест (4,2 пмоль/мг белка). Определены константы скорости образования и диссоциации комплекса гормон – рецептор ( $k_1$   $2,9 \cdot 10^6$  мин<sup>-1</sup>·М<sup>-1</sup> и  $k_{-1}$   $1,9 \cdot 10^{-2}$  мин<sup>-1</sup>) и время полужизни комплекса (35 мин). Установлена корреляция между основными параметрами связывания [<sup>3</sup>H]брадикинина плазматическими мембранами и количественными характеристиками действия брадикинина на изолированный рог матки крыс.

Первым этапом в реализации гормонального действия является узнавание и связывание гормона специфическими рецепторами клеток-мишеней. Рецепторы белковых и пептидных гормонов локализованы на поверхности клетки – в плазматической мембране [1–3].

Взаимодействие полипептидных гормонов с мембранными рецепторами служит объектом интенсивных исследований последних 10 лет. Одним из подходов в этих исследованиях является изучение связывания радиоактивных аналогов гормона с мембранной фракцией. Использование радиоактивных производных позволяет получить информацию относительно основных свойств гормон-рецепторного взаимодействия, таких, как сродство гормона к рецептору, кинетика взаимодействия, количество и гомогенность рецепторных мест связывания гормона, а также взаимоотношения между связыванием и биологическими эффектами гормона.

Брадикинин является тканевым пептидным гормоном. Спектр фармакологического действия брадикинина довольно широк, но основные его свойства – гипотензивная активность и стимуляция деятельности гладкой мускулатуры – определяются его способностью непосредственно взаимодействовать с гладкомышечной клеткой [4, 5].

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения рецепторного связывания [<sup>3</sup>H] брадикинина фракцией плазматических мембран клеток миометрия крыс.

Биохимические маркеры субклеточных фракций миометрия крыс

Маркер	Единица измерения	Гомогенат	Плазматические мембраны	Митохондрии	Микросомы	Ядра
Mg <sup>2+</sup> -АТФ-аза	мкмоль/мг·ч	20,6±7,3	179,1±40,6	23,5±8,8	47,8±21,6	7,6±3,7
5'-Нуклеотидаза	»	4,8±2,5	27,3±8,87	3,90±1,18	7,43±4,51	2,41±2,3
Сукцинатдегидрогеназа	»	0,87±0,40	0,45±0,17	3,41±1,90	0,86±0,28	0,60±0,14
NADPH-цитохром-с-редуктаза	$\Delta D_{430}$ /мг·ч	4,26±0,23	3,58±2,27	5,78±2,61	17,41±7,21	1,59±1,07
ДНК	мкмоль Р/мг белка	0,56	0,44	0,80	0,74	4,41
Холестерин/фосфолипиды	моль/моль		0,74	0,52	0,32	0,14

*Характеристика субклеточных фракций.* При градиентном центрифугировании гомогената миометрия крыс в слоях сахарозы с плотностью 1,10–1,13 концентрируется биологический материал, который по результатам определения активности маркерных ферментов (таблица) и данным электронно-микроскопического анализа представляет собой фракцию плазматических мембран.

В качестве индикаторных ферментов плазматических мембран, выделенных из различных источников, в том числе и из гладкомышечных тканей, обычно используются 5'-нуклеотидаза и Mg<sup>2+</sup>-АТФ-аза. Эти ферменты наиболее специфичны для фракции плазматических мембран, хотя обнаруживаются и в других субклеточных фракциях, в частности в эндоплазматическом ретикулуме [16]. Как видно из приведенных в таблице результатов, удельная активность 5'-нуклеотидазы и Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азы во фракции плазматических мембран в 6 и 9 раз соответственно выше, чем в исходном гомогенате. С этой фракцией связано ~33% 5'-нуклеотидазной и 42% АТФ-азной активности от общей активности этих ферментов в целом гомогенате. О достаточной чистоте полученной фракции плазматических мембран свидетельствует также низкая удельная активность в ней маркеров других субклеточных фракций (таблица). Эту фракцию отличает также высокое относительно фосфолипидов содержание холестерина (таблица). Молярное отношение холестерина к фосфолипидам в поверхностной мембране клетки выше, чем в мембранах других субклеточных фракций, что также является одним из характерных признаков плазматических мембран. Это отношение обычно колеблется от 0,68 до 0,83 в зависимости от ткани и степени чистоты фракции [17, 18]. Во фракции плазматических мембран отношение холестерин — фосфолипиды равно 0,74, в то время как в митохондриях — 0,52, в микросомах — 0,32 и в ядрах — 0,14.

Выход фракции составляет 4,6% от содержания белка в исходном гомогенате или 1,1 мг белка на 1 г влажного веса ткани.

На электронной микрофотографии\* плазматические мембраны представлены замкнутыми везикулами разных размеров и формы (рис. 1а). При большом увеличении (×75000) видна трехслойная структура мембран.

Во фракции саркоплазматического ретикулума обнаружены везикулы, элементы аппарата Гольджи, липосомы, отдельные митохондрии (рис. 1б).

Фракция митохондрий состоит в основном из целых митохондрий с двойной мембраной и кристами (рис. 1в).

*Характеристика брадикининсвязывающих мест.* Связывание [<sup>3</sup>H]брадикинина изучалось на целом гомогенате и отдельных субклеточных

\* Электронная микроскопия выполнена в лаборатории В. Л. Боровягина, Институт биофизики АН СССР.

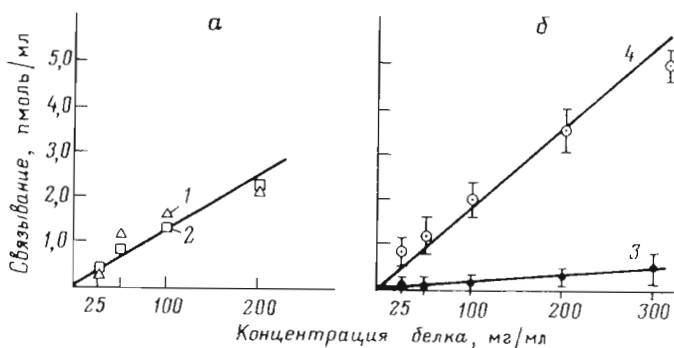


Рис. 2. Общее (а) и специфическое (б) связывание [<sup>3</sup>H]брадикинина в зависимости от концентрации белка: фракцией митохондрий (1), фракцией саркоплазматического ретикулула (2), гомогенатом (3), плазматическими мембранами (4)

фракциях: плазматических мембранах, митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме. Заметное связывание брадикинина происходит во всех изученных фракциях, и при постоянной концентрации гормона и содержании белка 25–300 мкг/мл оно пропорционально количеству белка в инкубационной пробе (рис. 2). Однако, как было установлено в опытах по конкурентному замещению [<sup>3</sup>H] брадикинина избытком немеченого гормона, насыщаемое, «специфическое», связывание обнаруживается только во фракции плазматических мембран, в то время как связывание брадикинина другими фракциями практически полностью неспецифично. Из представленных на рис. 2б данных видно также, что концентрация брадикининсвязывающих специфических мест во фракции плазматических мембран в 7–8 раз выше, чем в исходном гомогенате. Все эти результаты показывают, что рецептор брадикинина, как и других пептидных гормонов, локализован в поверхностной клеточной мембране.

Скорость связывания [<sup>3</sup>H]брадикинина плазматическими мембранами зависит от температуры. Равновесие достигается после начала инкубации через 5 мин при 30° и через 45 мин при 0° (рис. 3). Некоторое уменьшение связывания, которое наблюдается при более длительной инкубации при 30°, по-видимому, результат инактивации брадикинина мембранными кининазами. Так, было установлено, что при 30° через 10 мин после начала инкубации инактивируется около 20%, а через 15 мин — 35% брадикинина. Ферментативная деградация пептидных гормонов при изучении их рецепторного связывания происходит во многих системах и часто заметно искажает результаты связывания. При низких температурах активность деградирующих ферментов, в том числе и мембранных киназ, значительно снижается, что создает благоприятные условия для изучения рецепторного связывания [17, 18]. При 0° не происходит заметной инактивации брадикинина даже после 1,5 ч инкубации его с мембранной фракцией.

Связывание [<sup>3</sup>H]брадикинина зависит от pH среды. Оптимальной для связывания является область нейтральных значений pH 7,2–7,6 (рис. 4). Связывание резко падает даже при незначительном сдвиге pH в кислую сторону и гораздо медленнее снижается в щелочной области значений pH. Так, при pH 6,8 связывание составляет 30% от максимального, в то время как в сильно щелочной среде при pH 10,0 связывание только в 2 раза ниже максимального.

Важной характеристикой рецепторного связывания является его гормональная и биологическая специфичность. Рецепторные связывающие места должны взаимодействовать только с одним гормоном, и количество их должно коррелировать с биологической активностью гормона. О гор-

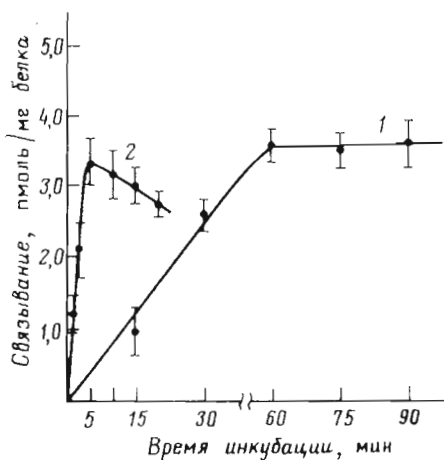


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика связывания  $[^3\text{H}]$ брадикинина фракцией плазматических мембран при  $0^\circ$  (1) и  $30^\circ$  (2)

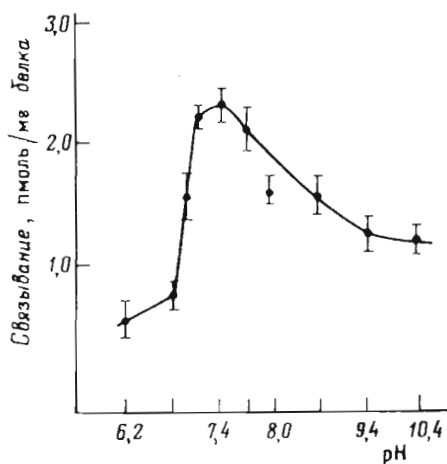


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость связывания  $[^3\text{H}]$ брадикинина от pH среды

мональной специфичности  $[^3\text{H}]$ брадикининсвязывающих мест свидетельствуют результаты, представленные на рис. 5. Связывание  $[^3\text{H}]$ брадикинина подавляется высокими концентрациями немеченого брадикинина и не изменяется в присутствии таких же количеств адренокортикотропного гормона (АСТН), окситоцина и сывороточного альбумина.

Зависимость связывания  $[^3\text{H}]$ брадикинина от концентрации гормона изучалась при определении общего и неспецифического связывания, т. е. в отсутствие и в присутствии немеченого брадикинина. Общее связывание измерялось в интервале концентраций гормона  $5 \cdot 10^{-10}$ – $5 \cdot 10^{-7}$  М. Неспецифическое связывание определялось при добавлении 100-кратных избытков немеченого брадикинина, которые создавали в инкубационной среде концентрации в интервале  $5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-5}$  М (рис. 6). Исследование зависимости связывания от концентрации гормона позволяет определить основные характеристики рецепторной системы, а именно число связывающих мест и константу средства или обратную ей величину — константу диссоциации комплекса гормон — рецептор. С этой целью результаты связывания анализируются, согласно Скетчарду, в координатах, где отношение связанного гормона к свободному рассматривается как функция концентрации гормона, связанного с рецептором [19]. Как видно из рис. 7, 1, скетчардовская кривая общего связывания  $[^3\text{H}]$ брадикинина представляет собой сложную кривую, состоящую по крайней мере из двух линейных компонентов. Такой характер кривой может или отражать существование двух дискретных типов связывающих мест, отличающихся разным средством к гормону, или являться результатом кооперативных отношений между гормоном и связывающими местами, при которых связывание гормоном одних рецепторных мест увеличивает скорость диссоциации комплекса гормона с другими связывающими местами. Это явление, известное как гомотропная отрицательная кооперативность, отмечается для рецепторного связывания многих гормонов [20, 21].

Анализ скетчардовской кривой общего связывания  $[^3\text{H}]$ брадикинина показал, что она является результатом суммирования двух процессов и может быть разложена на две линейные кривые. Одна из этих кривых (рис. 7, 2) получена экспериментальным путем при измерении связывания  $[^3\text{H}]$ брадикинина в присутствии 100-кратного избытка немеченого гормона, она располагается параллельно оси абсцисс и отражает неспе-

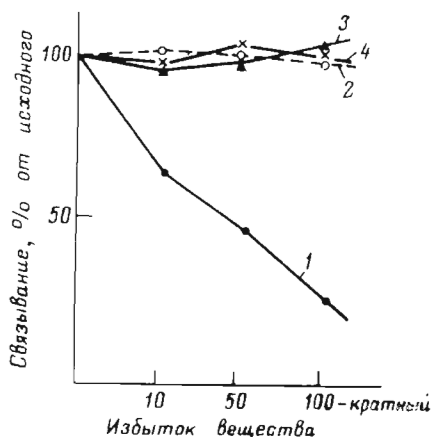


Рис. 5

Рис. 5. Действие на связывание [<sup>3</sup>H]брадикинина плазматическими мембранами возрастающих добавок немеченого брадикинина (1), АСТН (2), окситоцина (3) и сывороточного альбумина (4)

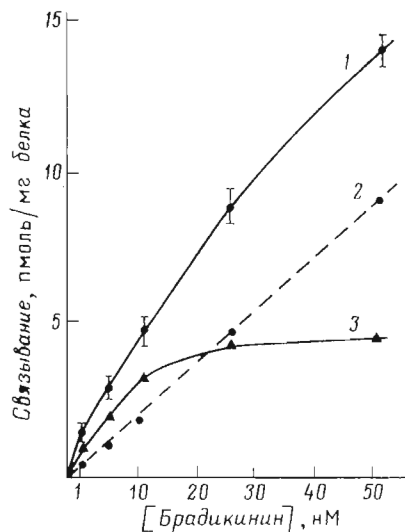


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость общего (1), неспецифического (2) и специфического (3) связывания [<sup>3</sup>H]брадикинина плазматическими мембранами от концентрации гормона

цифическое связывание, т. е. связывание, практически не насыщаемое в исследуемом интервале концентраций брадикинина. При вычитании из общего связывания неспецифического получена типичная для специфического рецепторного связывания кривая 3 (рис. 7). Линейный характер полученной кривой свидетельствует о гомогенности рецепторных брадикининсвязывающих мест плазматической мембраны клеток миотерия крыс. Количество их равно 4,2 пмоль/мг белка, насыщение происходит при концентрации брадикинина  $5 \cdot 10^{-8}$  М (рис. 6). Достаточно высокий индекс связывания  $K_{sp}$  0,32 и рассчитанная отсюда равновесная константа диссоциации  $K_d$   $2,7 \cdot 10^{-9}$  М свидетельствуют о высоком сродстве этих связывающих мест к брадикинину.

Кинетический анализ брадикинин-рецепторного взаимодействия (рис. 8, 9) позволил определить константы этого процесса. Константа скорости прямой реакции  $k_1$ , рассчитанная из уравнения

$$\ln \frac{[RH]_{eq}}{[RH]_{eq} - [RH]} = k_1 [H] t \quad [19],$$

равна  $2,9 \cdot 10^6 \text{ мин}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$ , а константа скорости обратной реакции  $k_{-1}$ , рассчитанная по уравнению

$$\ln \frac{[RH]}{[RH]_0} = k_{-1} t,$$

составляет  $1,9 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ .  $K_d$ , рассчитанная как  $k_{-1}/k_1 = 6,6 \cdot 10^{-9}$  М, достаточно близка по значению  $K_d$ , определенной при скетчардовском анализе связывания.

Время полужизни комплекса брадикинин — рецептор при 0°, определяемое по уравнению  $t/2 = \ln 2/k_{-1}$ , составляет 35 мин.

*Биологическое действие брадикинина.* Основные количественные параметры контрактильной активности брадикинина получены на изолированном роге матки крыс. Пороговой дозой брадикинина для этого препарата принято считать  $1 \cdot 10^{-10}$  М [22]. Однако чувствительность этого глад-

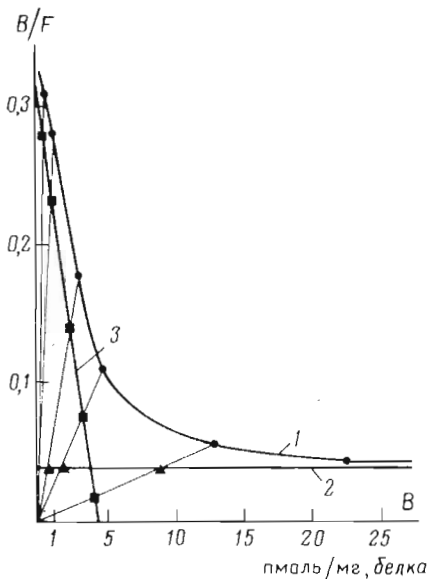


Рис. 7

Рис. 7. Скэтчардовские кривые общего (1), неспецифического (2) и специфического (3) связывания  $[^3\text{H}]$ брадикинина фракцией плазматических мембран. В — связанный брадикинин; F — свободный брадикинин

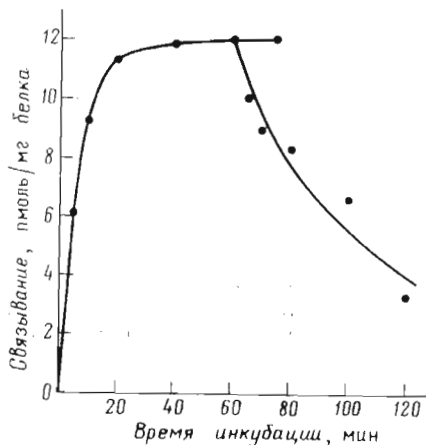


Рис. 8

Рис. 8. Кинетика связывания и диссоциации комплекса  $[^3\text{H}]$ брадикинин — рецептор

комышечного органа к брадикинину может колебаться в достаточно широких пределах — от  $5 \cdot 10^{-11}$  до  $2 \cdot 10^{-9}$  М [23, 24]. Концентрации брадикинина, вызывающие сокращение пороговой силы в наших опытах, лежат в области  $2 \cdot 10^{-10}$ — $1 \cdot 10^{-9}$  М. Соответственно меняются и значения концентраций, вызывающих максимальный ответ мышцы и ответ, равный половине от максимального ( $\text{ED}_{50}$ ). Среднее значение пороговой концентрации —  $7 \cdot 10^{-10}$ , максимальной —  $8,6 \cdot 10^{-8}$  и  $\text{ED}_{50}$  —  $9,0 \cdot 10^{-9}$  М.

Одним из важных критериев оценки рецепторного связывания принято считать соответствие основных параметров связывания и физиологического действия гормона на интактных системах. Такие данные связывания, как специфичность, сродство, число связывающих мест, должны быть сравнимы с биологической активностью лиганда. Однако строгая корреляция между гормон-рецепторным взаимодействием и биологическими эффектами гормона наблюдается очень редко. Она получена, например, при сравнении стимуляции инсулином транспорта  $\alpha$ -аминоизобутирата и связыванием инсулина на изолированных тимоцитах [23]. Практически полное совпадение количественных характеристик связывания и биологического действия было получено для ангиотензина на изолированном роге крысиной матки и фракции плазматических мембран, выделенных из клеток миомерия [24]:  $\text{ED}_{50} = 1 \cdot 10^{-8}$  М,  $K_d = 2 \cdot 10^{-8}$  М, концентрация ангиотензина, вызывающая максимальное сокращение мышцы ( $2 \cdot 10^{-7}$  М), и концентрация, насыщающая мембранные места связывания гормона ( $1 \cdot 10^{-7}$  М).

Как видно из приведенных на рис. 10 данных, между **контрактильным** действием брадикинина и связыванием его радиоактивного аналога также наблюдается достаточно близкое количественное соответствие. Специфическое связывание  $[^3\text{H}]$ брадикинина мембранной фракцией происходит в физиологической шкале концентраций гормона ( $5 \cdot 10^{-10}$ — $5 \cdot 10^{-8}$  М). Однако в отличие от ангиотензина концентрации брадикинина, вызывающие максимальное сокращение мышцы ( $3,6 \cdot 10^{-8}$  М), и значение  $\text{ED}_{50}$  ( $9,0 \cdot$

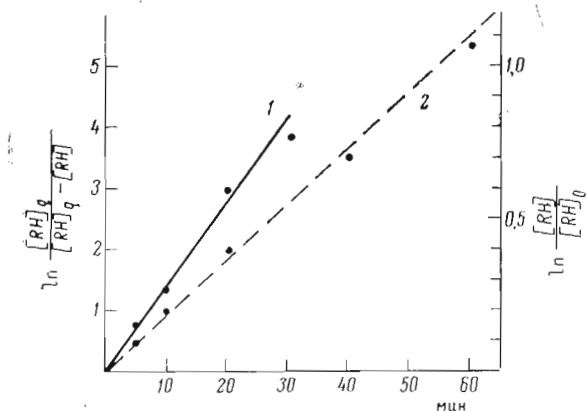


Рис. 9. Определение констант скорости связывания (1) и диссоциации (2) комплекса гормон — рецептор.  $[RH]$ ,  $[RH]_{eq}$ ,  $[RH]_0$  — концентрация комплекса в данное время, при равновесии и в начале диссоциации соответственно

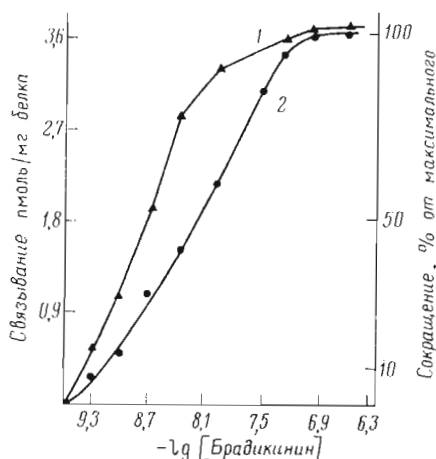


Рис. 10. Корреляция между связыванием брадикинина плазматическими мембранами (1) и его действием на изолированном роге матки крыс (2)

$\cdot 10^{-9}$  М) соответственно выше насыщающей для специфических мест связывания концентрации брадикинина ( $2,5 \cdot 10^{-8}$  М) и  $K_d$  ( $2,7 \cdot 10^{-9}$  М). Такое количественное расхождение между гормон-рецепторным взаимодействием и биологическим ответом можно объяснить влиянием многих факторов, среди которых для данных гормона и объекта наиболее существенны гетерогенность интактной системы, наличие в ней диффузионного барьера и кининазной активности.

Таким образом, связывание [ $^3H$ ]брадикинина мембранной фракцией удовлетворяет всем требованиям рецепторного связывания: оно обратимо, специфично, характеризуется высоким сродством к гормону, количество связывающих мест ограничено. Корреляция основных параметров связывания и биологического действия гормона также свидетельствует об идентичности брадикининсвязывающих мест плазматической мембраны и рецепторов матки крыс, взаимодействие которых с брадикинином инициирует мышечное сокращение.

## Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие препараты: брадикинин-триацетат (Reanal, ВНР); [<sup>3</sup>H]брадикинин, уд. акт. 7,5 Ки/ммоль, синтезированный в Институте изотопов АН ВНР; АСТН, уд. акт. 100 МЕ/мг (Serva, ФРГ); окситоцин, уд. акт. 5 МЕ/мг (Richter, ВНР); сывороточный альбумин (Koch-Light Lab., Англия).

*Определение активности маркерных ферментов.* Активность Mg<sup>2+</sup>-АТР-азы (КФ 3.6.1.4) в 50 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4), содержащем 5 мМ АТР и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Инкубация проводилась при 37° в течение 15 мин.

Активность 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) определялась в тех же условиях при концентрации АМР 5 мМ [7].

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1) определялась по модифицированному методу Слайтера [8].

Удельные активности АТР-азы, 5'-нуклеотидазы и сукцинатдегидрогеназы выражались в мкмоль — мкмоль превращенного субстрата на 1 мг белка в 1 ч.

Активность NADPH цитохром-с-редуктазы (КФ 1.6.2.3) измерялась на спектрофотометре Spesord UV VIS и выражалась в изменении оптической плотности ( $\Delta D_{430}$ ) на 1 мг белка в 1 ч [8]. Содержание ДНК измерялось дифениламиновым методом [12] и выражалось в мкмоль фосфора ДНК на 1 мг белка.

Белок определяли по методу Лоури [9], фосфор — по методу Бартлета [10], холестерин — по модифицированному методу Либермана — Бурхарда [11].

Определение кининазной активности проводилось биологическим методом, основанным на измерении остаточной активности брадикинина в разные сроки после инкубации с ферментным препаратом [14].

*Выделение субклеточных фракций.* Фракционирование гладкомышечной ткани проводилось по схеме, предложенной для этой ткани Кидвеем и соотр. [6]. Некоторые модификации были введены с целью увеличения выхода мембранной фракции и получения других субклеточных фракций.

Сахарозный градиент приготавливали за 16—18 ч до работы последовательным наслоением равных объемов 43,5; 34,5 и 30,0% растворов сахарозы в 10 мМ трис-EDTA-буфере (рН 7,1).

Выделение субклеточных фракций проводилось в 10 мМ трис-EDTA-буфере (рН 7,1), содержащем 0,25 М маннит.

Животные забивались декапитацией. У изолированных рогов матки удаляли эндометрий. Мышечный слой измельчали, пропускали через пресс и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в течение 3 мин при 6500 об/мин (Omni mixer 17220, Sorvall Newtown Conn., США). Гомогенат фильтровали через капроновую ткань, осадок разбавляли буфером, снова гомогенизировали при той же скорости 1 мин и повторяли фильтрование. Объединенные фильтраты центрифугировали в течение 5 мин при 2500 об/мин для удаления крупных фрагментов и неразрушенных клеток. Супернатант, который в дальнейшем называется исходным гомогенатом для выделения субклеточных фракций, центрифугировали 1 ч при 145 000g (Sprinco L250, ротор 50Ti). Полученный осадок суспендировали в небольшом объеме буфера, наслаивали на сахарозный градиент и центрифугировали в течение 2 ч при 111 000g (ротор SW 40). В результате были получены два слоя и осадок. Первый слой ( $d$  1,10—1,13) собирали, разбавляли буфером и переосаждали в течение 1 ч при 145 000g (ротор 50Ti). Второй слой ( $d$  1,15—1,20) собирали, разбавляли буфером до концентрации сахарозы 8% и для выделения митохондриальной фракции центрифугировали 30 мин при 18 000 об/мин. Фракцию саркоплазматического ретикулума получали осаждением полученного при предыдущем центрифугировании супернатанта в течение 1 ч



при 145 000g (ротор 50Ti). Для выделения ядерной фракции осадок, полученный при градиентном центрифугировании, собирали, суспендировали в небольшом объеме буфера и наслаивали на двуступенчатый сахарозный градиент (1,8 и 2,2 М сахарозы в 10 мМ трис-EDTA-буфере) и центрифугировали 1,5 ч при 33 000g (ротор SW 40). Ядра концентрировались в слое над 2,2 М сахарозой.

Все операции по выделению субклеточных фракций проводились при температуре от 0 до 4°.

*Изучение связывания [<sup>3</sup>H]брадикинина субклеточными фракциями миометрия крыс.* Связывание радиоактивного брадикинина (5 мМ) изучалось при инкубации его 40–60 мин при 0° с субклеточными фракциями (200 мкг белка/мл) в 10 мМ гистидин-имидазольном буфере (рис. 2, 3) кроме определения зависимости связывания от значения pH среды, которое проводилось в 50 мМ трис-HCl-буфере (рис. 4). Общий объем пробы 0,5 мл.

Разделение связанного и свободного брадикинина осуществлялось быстрой фильтрацией (10–20 с) проб на мембранных фильтрах PHWP (Millipore, США) с диаметром пор 0,3 мк. Адсорбция брадикинина на фильтрах определялась путем фильтрации контрольных проб, отличающихся от опытных только отсутствием в них биологического материала.

Фильтры опытные и контрольные растворяли в 10 мл сцинтиллятора по Брею [15] и радиоактивность измеряли на счетчике Mark II (Nuclear, Chicago, США).

Неспецифическое связывание измерялось в присутствии 500 нМ немеченого брадикинина.

Определение специфичности связывания (рис. 5) проводилось при концентрации [<sup>3</sup>H]брадикинина в инкубационной пробе 5 нг/мл и концентрациях немеченых соединений: брадикинина, АСТН, окситоцина и сывороточного альбумина 50, 250 и 500 нг/мл соответственно, т. е. в 10, 50 и 100 раз превышающих концентрацию меченого гормона.

Зависимость связывания меченого брадикинина плазматическими мембранами от концентрации гормона в инкубационной среде определялась в интервале его концентраций  $5 \cdot 10^{-10}$ – $5 \cdot 10^{-7}$  М (рис. 6). Неспецифическое связывание измерялось в присутствии 100-кратных избытков немеченого брадикинина, т. е. при его концентрации  $5 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-5}$  М. Скорость образования и распада комплекса гормон–рецептор определяли при 50 нМ концентрации [<sup>3</sup>H]брадикинина, являющейся насыщающей для специфических связывающих мест. Диссоциация комплекса определялась при 10-кратном разбавлении инкубационной пробы буфером после достижения равновесия реакции связывания.

Контрактильное действие брадикинина изучали на изолированном роге крысиной матки, как это было описано ранее [14].

Авторы статьи выражают глубокую благодарность проф. К. Медзиградскому (Институт изотопов АН ВНР) за любезное предоставление препарата меченого брадикинина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cuatrecasas P. (1974) Annual. Rev. Biochem., 43, 169–214.
2. Kahn C. R. (1976) J. Cell. Biol., 70, 261–286.
3. Catt K. J., Dufau M. L. (1976) Biol. Reproduc., 14, 1–15.
4. Khairallah P. A., Page I. H. (1963) Ann. N. Y. Acad. Sci., 104, 212–221.
5. Hall D., Boute I. L. (1972) Arch. int. Pharmacodyn., 197, 380–392.
6. Kidwai A. M., Rodcliffe M. A., Daniel E. E. (1970) Biochim. et biophys. acta, 233, 538–549.
7. Song C. S., Bodemski O. (1967) J. Biol. Chem., 242, 694–706.
8. Slater E. C., Bonner W. D. (1952) Biochem. J., 52, 185–196.
9. Sottocasa G. L., Kuyleustierna L. B., Eruster L., Bergstrand A. (1967) J. Cell Biol., 32, 415–438.
10. Löwry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265–275.
11. Bartlett J. R. (1959) J. Biol. Chem., 234, 466–474.

12. Abel L. L., Levy B. B., Brodie B. B., Kendall F. E. (1952) *J. Biol. Chem.*, **195**, 375-386.
13. Groot D. N., Lubran M. (1965) *Biochem. J.*, **95**, 612-620.
14. Попкова Г. А., Астапова М. В., Лисункин Ю. И., Равдель Г. А., Крит Н. А. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1606-1612.
15. Bray G. A. (1960) *Anal. Biochem.*, **1**, 279-285.
16. Widnell C. C., Unkeless J. C. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 1050-1057.
17. Kahn C. R., Freychet P., Roth J., Neville D. M., Jr. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2249-2257.
18. Dufau M. L., Charrean E. H., Catt K. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 6973-6982.
19. Coleman R. (1968) *Chem. Phys. Lipids*, **2**, 144-146.
20. Ashworth L. A. E., Green C. (1966) *Science*, **151**, 210-211.
21. Scatchard G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660-672.
22. De Meyts P., Roth J., Neville D. M., Jr., Gavin J. R., Lesniak M. A. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **55**, 154-161.
23. Tate R. L., Schwartz H. A., Holmes J. M., Kohn L. D. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6509-6515.
24. Elliot D. F., Horton E. W., Levis G. P. (1960) *J. Physiol.*, **151**, 473-485.
25. Konzett H., Stümer E. (1960) *Brit. J. Pharmacol.*, **15**, 544-552.
26. Saameli K., Eskes T. K. (1962) *Amer. J. Physiol.*, **203**, 261-269.
27. Goldfine I. D., Gardner J. D., Neville D. M., Jr. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6919-6926.
28. Ronzaine-Dubois B., Devynck M. A., Chevillotte E., Meyer P. (1975) *FEBS Lett.*, **55**, 168-172.

Поступила в редакцию  
15.IX.1978

## RECEPTOR BINDING OF [<sup>3</sup>H]BRADYKININ IN PLASMA MEMBRANES OF RAT MYOMETRIUM

ПОПКОВА Г. А., АСТАПОВА М. В., ИВАНОВ В. Т.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Plasma membranes, mitochondria, sarcoplasmic reticulum and nuclei have been prepared from rat myometrium and characterized by biochemical markers and electron microscopy. The [<sup>3</sup>H]bradykinin binding to subcellular fractions was examined and found to be specific only for plasma membranes, wherein it was inhibited by unlabelled bradykinin and not affected by the same concentrations of ACTH, oxytocin, or serum albumin. This binding revealed low dissociation constant ( $K_d=2.7 \cdot 10^{-9}$  M) and a limited number of binding sites ( $4.2 \cdot 10^{-12}$  mol/ml protein). The binding of [<sup>3</sup>H]bradykinin to membranes was reversible and dependent on temperature, protein concentrations and pH. The kinetic studies provided the association ( $k_1=2.9 \cdot 10^6$  min<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>) and dissociation ( $k_{-1}=1.9 \cdot 10^{-2}$  min<sup>-1</sup>) rate constants, as well as half-life for hormone-receptor complex of 35 min. A correlation was found between the main binding parameters and the quantitative characteristics of hormone action on rat uterine muscle.